



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09080037 A**(43) Date of publication of application: **28.03.97**

(51) Int. Cl. **G01N 30/02**  
**G01N 30/48**  
**G01N 30/60**  
**G01N 30/84**  
**G01N 30/88**  
**G01N 33/68**

(21) Application number: **07236697**(22) Date of filing: **14.09.95**(71) Applicant: **HITACHI LTD**

(72) Inventor: **FUJII YOSHIO**  
**ITO MASATO**  
**SATAKE HIROSHI**

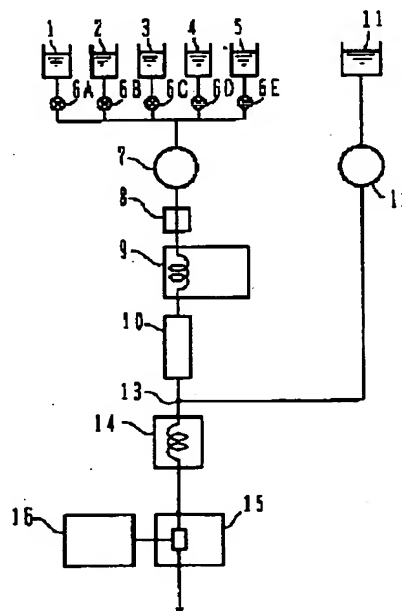
(54) **AMINO ACID ANALYZER**

## (57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a higher-speed and high-separation amino acid analyzer.

**SOLUTION:** An amino acid analyzer comprises a separation column 10, a buffer-solution pump 7 which feeds a plurality of buffer solutions 1, 2, 3, 4 to the separation column 10, a sampler 9 which is installed in a flow passage between the buffer-solution pump 7 and the separation column 10, and a reaction coil 14 by which an amino acid separated by the separation column 10 is mixed with a ninhydrin reagent so as to be reacted. In this case, the separation column 10 is formed in such a way that the ratio ( $L1/R$ ) of its length  $L1$  to its inside diameter  $R$  is at 10 or lower and that the particle size of an ion-exchange resin to be filled into the separation column 10 is at  $1\mu\text{m}$  or lower.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-80037

(43) 公開日 平成9年(1997)3月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	30/02		G 0 1 N 30/02	B
	30/48		30/48	G
	30/60		30/60	A
	30/84		30/84	A
	30/88		30/88	F
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 22 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-236697

(22) 出願日 平成7年(1995)9月14日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 藤井 芳雄

茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会

社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 伊藤 正人

茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会

社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 佐竹 尋志

茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会

社日立製作所計測器事業部内

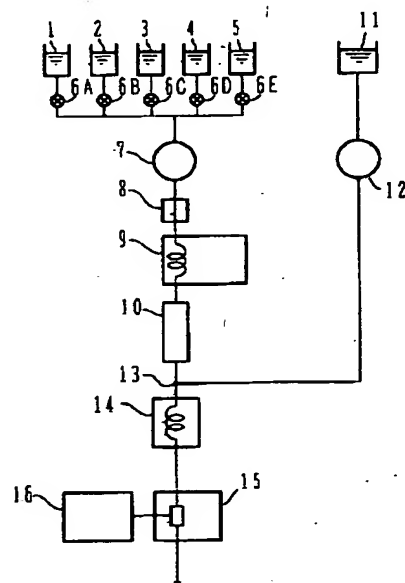
(74) 代理人 弁理士 春日 譲

(54) 【発明の名称】 アミノ酸分析装置

(57) 【要約】

【目的】本発明の目的は、より高速で、しかも、高分離なアミノ酸分析装置を提供するにある。

【構成】分離カラム10と、分離カラム10に複数の緩衝液1, 2, 3, 4を送液する緩衝液ポンプ7と、緩衝液ポンプ7と分離カラム10の間の流路に設けられ、分析試料を流路に導入するサンプラー7と、分離カラム10により分離したアミノ酸をニンヒドリン試薬と混合した上で反応させる反応コイル14から構成されており、ここで、分離カラム10は、その長さL1とその内径Rとの比 ( $L1/R$ ) が10以下であり、分離カラム10に充填するイオン交換樹脂の粒径が  $4 \mu m$  以下としている。



7: 緩衝液ポンプ  
8: オートサンプラー  
10: 分離カラム  
14: 反応コイル

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 分離カラムと、

この分離カラムに複数の緩衝液を送液する送液手段と、  
この送液手段と上記分離カラムの間の流路に設けられ、  
分析試料を流路に導入するサンプラーと、  
上記分離カラムにより分離したアミノ酸をニンヒドリン  
試薬と混合した上で反応させる反応手段とを有するアミ  
ノ酸分析装置において、  
上記分離カラムは、その長さL1とその内径Rとの比  
(L1/R)が10以下であり、

この分離カラムに充填するイオン交換樹脂の粒径が4 $\mu$   
m以下であることを特徴とするアミノ酸分析装置。

【請求項2】 請求項1記載のアミノ酸分析装置におい  
て、

上記分離カラムの内径Rは、5mm以上であることを特  
徴とするアミノ酸分析装置。

【請求項3】 請求項1記載のアミノ酸分析装置におい  
て、

上記分離カラムの内径Rは、7mm以下であることを特  
徴とするアミノ酸分析装置。

【請求項4】 請求項1記載のアミノ酸分析装置におい  
て、

上記分離カラムを流れる上記緩衝液の線速度は、36m  
m/min以下であることを特徴とするアミノ酸分析装  
置。

## 【請求項5】 分離カラムと、

この分離カラムに複数の緩衝液を送液する送液手段と、  
この送液手段と上記分離カラムの間の流路に設けられ、  
分析試料を流路に導入するサンプラーと、  
上記分離カラムにより分離したアミノ酸をニンヒドリン  
試薬と混合した上で反応させる反応手段とを有するアミ  
ノ酸分析装置において、  
上記反応手段に用いる反応コイルの内径をr(mm)と  
し、この反応コイルの長さをL2(m)とし、この反応  
コイルを流れる液体の流速をf(ml/min)とする  
と、 $(r^4 \cdot L2 / f)$ を $2.5 \times 10^{-3} (mm^4 \cdot m /$   
 $(ml/min))$ 以下としたことを特徴とするアミノ  
酸分析装置。

【請求項6】 請求項5記載のアミノ酸分析装置におい  
て、

上記反応手段に用いる反応コイルの内径r(mm)が、  
0.25mm以下であり、この反応コイルを流れる液体  
の流速が、1.0ml/min以上であることを特徴と  
するアミノ酸分析装置。

【請求項7】 請求項5記載のアミノ酸分析装置におい  
て、

上記反応手段に用いる反応コイルを流れる液体の線速度  
が、20m/min以上であることを特徴とするアミノ  
酸分析装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミノ酸分析装置に係  
り、特に、液体クロマトグラフィーによる高速アミノ酸  
分析に好適なアミノ酸分析装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 アミノ酸分析法は大別して、蛋白加水分  
解物アミノ酸約18成分のアミノ酸分析を対象とした標  
準分析法(以下「標準法」と言う)と、生体液アミノ酸類  
緑物質のアミノ酸分析を対象とした生体液法(以下「生  
体液法」と言う)に分類できる。従来のアミノ酸分析方  
法及び装置の中で、標準法については、例えば、特開昭  
64-44848号公報、特公平3-10076号公報  
や特公平4-64584号公報に記載されており、ま  
た、生体液法については、特公平2-59428号公報  
や特公平4-194750号公報に記載されている。

【0003】 アミノ酸分析は、分析成分数が多いため  
に、分析時間が長くなっている。従来は、標準法では  
30分、生体液法では、110分乃至140分を要して  
いた。

## 20 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上述したように、標準  
法で30分を要するアミノ酸分析装置においては、その  
装置の条件としては、例えば、特開平1-227959  
号公報に記載のように、イオン交換樹脂の粒径3 $\mu$ mで  
あり、このイオン交換樹脂を充填する分離カラムの内径  
は、4.6mmである。また、この公報には明示はない  
が、このカラムの長さは、60mmのものである。ま  
た、30分でアミノ酸を標準法で分析する時、緩衝液流  
速は、0.46ml/minであり、その時の負荷圧力  
は、約110kgf/cm<sup>2</sup>である。

【0005】 一般に、分析時間は、緩衝液流速にはほぼ反  
比例する。従って、緩衝液流速を0.55ml/min  
に上昇させると、理論的には、分析時間を25分に短縮  
できるが、この時の負荷圧力は、約130kgf/cm<sup>2</sup>  
となる。分離カラムの限界負荷圧力は、装置によっ  
ても異なり、また、分析者によっても限界負荷圧力と認定  
する圧力値は異なっており、この限界負荷圧力を越えた  
カラムは、再充填が必要となってくる。ここで、限界負  
荷圧力を、仮に、150kgf/cm<sup>2</sup>とすると、上述  
のように、分析時間が25分となるように緩衝液流速を  
設定した場合には、当初の分析は可能であるが、分析の  
回数を重ねると、カラムの負荷圧力が増加してくるた  
め、30分分析に比べて、カラムの寿命が短くなる。

【0006】 従って、上述の分離カラムでは、25分分  
析は可能ではあるが、分離カラムの寿命は短く、実用的  
でないという問題がある。また、25分分析より速い分  
析は、限界負荷圧力との関係において不可能であるとい  
う問題がある。

【0007】 以上のことは、生体液法でも同じことが言  
える。生体液法は、標準法と緩衝液の成分が異なり、ま

た、スタート時のカラム温度が異なるので、流速と圧力の関係は標準法と同じにはならず、約20%上昇する。

【0008】ここで、イオン交換樹脂の粒径を大きくすれば、圧力損失は小さくできるが、そうすると、イオン交換樹脂による各アミノ酸成分の分離が悪いということになる。

【0009】従って、従来の装置にあっては、分離を損なうことなく、より速く分析することが困難であるという問題があった。

【0010】また、分離カラムの出口において、高分離が可能であっても、この分離カラム以外の場所における拡がりの影響によって、一旦分離されたものが融合し、検知器である光度計によって検出する時点では、所定の分離率が得られなくなる場合がある。即ち、カラム外拡がりの影響によって分離が阻害されるという問題があった。

【0011】本発明の目的は、より高速で、しかも、高分離なアミノ酸分析装置を提供するにある。

【0012】本発明の他の目的は、カラム外拡がりの影響を勘案して、分離の損なわれることなく、高分離なアミノ酸分析装置を提供するにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、分離カラムと、この分離カラムに複数の緩衝液を送液する送液手段と、この送液手段と上記分離カラムの間の流路に設けられ、分析試料を流路に導入するサンプラーと、上記分離カラムにより分離したアミノ酸をニンヒドリン試薬と混合した上で反応させる反応手段とを有するアミノ酸分析装置において、上記分離カラムは、その長さL1とその内径Rとの比(L1/R)が10以下であり、この分離カラムに充填するイオン交換樹脂の粒径が4 $\mu$ m以下であるようにしたものである。

【0014】上記アミノ酸分析装置において、好ましくは、上記分離カラムの内径Rは、5mm以上であるようにしたものである。

【0015】上記アミノ酸分析装置において、好ましくは、上記分離カラムの内径Rは、7mm以下であるようにしたものである。

【0016】上記アミノ酸分析装置において、好ましくは、上記分離カラムを流れる上記緩衝液の線速度は、36mm/min以下であるようにしたものである。

【0017】また、上記その他の目的を達成するために、本発明は、分離カラムと、この分離カラムに複数の緩衝液を送液する送液手段と、この送液手段と上記分離カラムの間の流路に設けられ、分析試料を流路に導入するサンプラーと、上記分離カラムにより分離したアミノ酸をニンヒドリン試薬と混合した上で反応させる反応手段とを有するアミノ酸分析装置において、上記反応手段に用いる反応コイルの内径をr(mm)とし、この反応コイルの長さをL2(m)とし、この反応コイルを流れ

る液体の流速をf(ml/min)とすると、( $r^4 \cdot L2/f$ )を $2.5 \times 10^{-3}$ ( $\text{mm}^4 \cdot \text{m} / (\text{ml} / \text{min})$ )以下とするようにしたものである。

【0018】また、反応手段に用いる反応コイルの内径r(mm)が、0.25mm以下であり、この反応コイルを流れる液体の流速が、1.0ml/min以上であるようにしたものである。

【0019】上記アミノ酸分析装置において、好ましくは、上記反応手段に用いる反応コイルを流れる液体の線速度が、20m/min以上であるようにしたものである。

【0020】

【作用】本発明では、分離カラムは、その長さL1とその内径Rとの比(L1/R)が10以下であり、この分離カラムに充填するイオン交換樹脂の粒径が4 $\mu$ m以下であるようにすることにより、分離カラムの内圧を高めることなく、緩衝液流速を速めることができるので、高速分析を可能とし得るものとなる。

【0021】また、分離カラムの内径Rは、5mm以上とすることにより、標準液25分以上の高速分析を可能とし得るものとなる。

【0022】また、さらに、分離カラムの内径Rは、7mm以下とすることにより、感度の低下をもたらすことなく、高速分析を可能とし得るものとなる。

【0023】また、分離カラムを流れる緩衝液の線速度は、36mm/min以下とすることにより、緩衝液の線速度と分離カラムの内圧の関係が直線から外れることのない領域内での分析を可能とし、分離カラムの長寿命化を可能とし得るものとなる。

【0024】また、本発明では、反応手段に用いる反応コイルの内径をr(mm)とし、この反応コイルの長さをL2(m)とし、この反応コイルを流れる液体の流速をf(ml/min)とすると、( $r^4 \cdot L2/f$ )を $2.5 \times 10^{-3}$ ( $\text{mm}^4 \cdot \text{m} / (\text{ml} / \text{min})$ )以下とすることにより、分離された成分の反応コイルにおける広がりを押さえ、分離率を低下されることのない分析が可能とし得るものとなる。

【0025】また、さらに、反応手段に用いる反応コイルの内径r(mm)が、0.25mm以下であり、この反応コイルを流れる液体の流速が、1.0ml/min以上とすることにより、反応コイルにおける広がりの影響の内、内径による要素を実用的な範囲で押さえ、分離率を低下されることのない分析が可能とし得るものとなる。

【0026】また、反応手段に用いる反応コイルを流れる液体の線速度が、20m/min以上とすることにより、分離率を低下されることのない分析が可能とし得るものとなる。

【0027】

【実施例】本発明の一実施例について説明する前に、本

発明の要点について、以下に説明する。

【0028】上述したように、分析時間は、緩衝液流速にはほぼ比例するものと考えられている。そこで、分析時間を速める目的で緩衝液流速を上げていくと、カラム負荷圧力が異常に上昇し、緩衝液流速とカラム負荷圧力の関係が直線上より上に外れ、図1に示すような関係となることが実験により確かめられた。

【0029】ここで、図1(A)は、従来から用いていた内径4.6mmで長さが60mmの分離カラムを用いて緩衝液流速を、それぞれ、0.2ml/min, 0.3ml/min, 0.4ml/min, 0.5ml/min, 0.6ml/min, 0.7ml/min, 0.8ml/minと変えた時の、流速に対するカラム圧力(kgf/cm<sup>2</sup>)の関係を図示したものである。図1(A)に示すように、緩衝液流速が0.6ml/minまでは、緩衝液流速とカラム圧力の関係は、直線関係にある。しかしながら、緩衝液流速が0.6ml/minを越えると、直線関係から外れることが判明した。緩衝液流速を0.7ml/minに上昇させると、カラム負荷圧力は、172kgf/cm<sup>2</sup>となった。即ち、このことは、長時間のカラム寿命も圧力上昇により保てなくなることを意味している。

【0030】さらに、ここで、カラムの内径を変えずに、長さのみを変えて緩衝液流速とカラム圧力との関係を調べたのが、図1(B)である。図1(B)では、内径4.6mmで、長さが40mmの分離カラムを用いて、緩衝液流速とカラム圧力を調べたものである。

【0031】図1(B)に示すとおり、長さ40mmの分離カラムにおいても、緩衝液流速が0.6ml/minを越えると、直線関係から外れることが判明した。緩衝液流速が0.6ml/minの時のカラム圧力は、88kgf/cm<sup>2</sup>であり、緩衝液流速が0.7ml/minの時のカラム負荷圧力は、112kgf/cm<sup>2</sup>であり、長さ60mmのものとは比べると、それよりも低いカラム圧力でありながら、使用限界となったことがわかった。このことは、カラムの使用限界は、カラム負荷圧力ではなく、カラムを流れる緩衝液の線速度にあるものと発明者らは考えた。

【0032】ちなみに、カラム内径が4.6mmの分離カラムを流れる緩衝液流速が0.6ml/minの時の、カラム線速度は、36mm/minである。

【0033】なお、この現象は、粒径4μm以下のような微細なイオン交換樹脂を使用する際に現れる現象であり、粒径4μm以下のような微細なイオン交換樹脂の特質であると考えられる。

【0034】そこで、発明者は、上述した知見に基づいて、このカラム線速度の限界を守りつつ、緩衝液流速を速めるために、カラムサイズについて検討を加え、カラムの内径を大きくすることとした。分離カラムの内径を大きくすることにより、緩衝液流速を速めることがで

き、理論的には、分析時間は短縮できるものと考えたものである。それと同時に、粒径4μm以下の微細樹脂を用いてカラム効率をよくしたため、緩衝液流速を高めた際に考えられる分離カラムの圧力損失が大きくなるのを防止するため、分離カラムの長さを短くするようにしている。そして、分離カラムの内径Rと長さL1の比(L1/R)について検討した結果、この比が、10以下とするようにしたものである。

【0035】また、上述したような分離カラムを用いて、高速分析を可能とし、しかも、分離カラム出口における分離率を高めたとしても、分離カラムより後段の流路系によるカラム外の拡がりの分離に与える影響が大きくなる。

【0036】カラム外の拡がりに影響を与える流路部品においては、反応コイルの寄与率が約80%あることが、実験により確かめられた。そこで、この反応コイルにおける拡がりの影響について検討すると、反応コイル内の試料ゾーンの拡がりσ<sup>2</sup>は、以下の(数1)で表せる。

【0037】 $\sigma^2 = \pi r^4 f L_2 / 24 D_m$  (数1)  
ここで、rは、反応コイルの半径(mm)、fは、カラム流速(m<sup>3</sup>/s)、L<sub>2</sub>は、反応コイルの長さ(m)、D<sub>m</sub>は、緩衝液の溶質の拡散定数とし、層流を条件とする。

【0038】拡がりσの単位は、体積(m<sup>3</sup>)であるが、クロマトグラム上では時間(s)が一般的横軸である。そこで、時間を単位とする拡がりをσ\* (s)とする。

【0039】 $\sigma^{*2} = \pi r^4 L_1 / 24 f D_m$  (数2)  
ここで、時間を単位とする拡がりσ\*について検討してみると、クロマトグラムは、図2に示すような形状をしている。図2において、横軸は、時間(min)を表している。このようなクロマトグラムにおいて、ピークの標準偏差σ<sub>1</sub>は、通常10s程度である。従って、ピークの標準偏差σ<sub>1</sub>の自乗(σ<sub>1</sub>)<sup>2</sup>は、100となり、拡がりを20%以内に押さえることができれば、その拡がりは分離上無視できるものとなる。

【0040】従って、数3を満たすような拡がりσ\*を求めると、拡がりσ\*を4s以下にすれば、分離上無視できるものと考えられる。

【0041】 $(\sigma^*)^2 < 0.2 \times 100$  (数3)  
クロマトグラムの横軸の時間単位としては、分(min)を用いるため、拡がりσ\*を、0.067min以下とすればよい。

【0042】上述の(数2)からわかるように、時間を単位とする拡がりσ\*は、反応コイルの内径r、反応コイルの長さL<sub>2</sub>及びカラム流速の関数となる。従って、拡がりσ\*を、0.067min以下とするための、

$(r^4 \cdot L_2) / f$ の条件について求めてみると、拡散定数D<sub>m</sub>は、1.20×10<sup>-9</sup>(m<sup>2</sup>/s)であることが

実験的に求められているので、

$$(r^4 \cdot L2) / f < 1.5 \times 10^{-7} \quad (\text{m}^2 \cdot \text{s}) \quad (\text{数4})$$

の条件を満たせばよい。数4を液体クロマトグラフで一般に使用する単位で表すと、

$$(r^4 \cdot L2) / f < 2.5 \times 10^{-3} \quad (\text{mm}^4 \cdot \text{m} / (\text{ml} / \text{min})) \quad (\text{数5})$$

となる。

【0043】また、上述の(数2)からわかるように、時間を単位とする拡がり $\sigma^*$ は、流量 $f$ が増えるほど、小さくなる。つまり、所定の $r$ 、 $L2$ を与えられた場合、流量 $f$ を大きくすることによって、カラム外の拡がり $\sigma^*$ の影響を小さくすることができる。

【0044】一般に使用されている反応コイルの内径 $r$ は、0.25mmの上のサイズは、0.33mmである。(数2)から明らかなように、時間を単位とする拡がり $\sigma^*$ に対しては、内径 $r$ の4乗で影響するので、内径 $r$ は、小さい方が好ましく、ここで、内径 $r$ を0.25mm以下のものとする。

【0045】反応コイルの長さ $L2$ は、長い方が、反応時間が長くとれるので、感度向上の点で好ましいが、上述の(数2)からわかるように、反応コイルの長さ $L2$ を長くすると、拡がり $\sigma^*$ が大きくなるので、両者の兼ね合いの点から、長さ $L2$ を10m以下とする。

【0046】以上のようにして、反応コイルの内径 $r$ を0.25mm以下、長さを10m以下として、(数5)を満たすカラムを流れる液の流量 $f$  (ml/min) を求めると、

$$f \geq 2.5 \times 10^{-3} \quad (\text{ml} / \text{min})$$

の条件を満たすように、反応コイルを流れる液の流量 $f$ とすればよいことが分かる。

【0047】ここで、上述の条件における反応コイルを流れる液の線速度を求めてみると、反応コイルの内径 $r$ が0.25mmで、カラムを流れる液の流量 $f$ が $2.5 \times 10^{-3}$  (ml/min)の時、線速度は、20 (m/min)であればよいことが分かる。

【0048】以上述べた本発明の要点に基づいて実施した本発明の一実施例について、以下に、図3～図6、図8、図9を用いて説明する。図3は、本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置の構成図である。

【0049】第1緩衝液1、第2緩衝液2、第3緩衝液3、第4緩衝液4及びカラム再生液5は、順次、電磁弁6A、6B、6C、6D、6Eによって選択されて、緩衝液ポンプ7によって、アンモニアフィルタ8に送られる。ここで、例えば、第2緩衝液2と第3緩衝液3とを所定の比率で混合した混合緩衝液を送出する場合には、電磁弁6B、6Cが交互に動作するが、この詳細については、後述する。

【0050】アンモニアフィルタ8を通過した緩衝液等は、さらに、オートサンプラー9を経由して、分離カラム1に送られる。オートサンプラー9によって導入された

アミノ酸試料は、分離カラム10で分離される。ここで分離した各アミノ酸は、ニンヒドリンポンプ12によって送られてきたニンヒドリン試薬11とミキサ13で混合し、反応コイル14で反応する。反応によって発色したアミノ酸は、光度計15で連続的に検知され、データ処理装置16によってクロマトグラム及びデータとして出力され、記録、保存される。

【0051】次に、図4を用いて、イオン交換樹脂を充填した分離カラムの構造について説明する。図4は、本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置に用いる分離カラムの断面図である。

【0052】カラム筒21には、イオン交換樹脂22が充填されている。カラムキャップ25には、テフロン製のリング状のシール24とともに、フィルタ23が圧入装着されている。

【0053】カラム筒21にイオン交換樹脂22を充填後、カラムキャップ25が、カラム筒21にねじ込まれると、シール24のシール性により、フィルタ23はしっかりと固定され、耐圧が保たれるようになっている。また、フィルタ23は、若干カラム筒21内にめり込むことにより、充填されたイオン交換樹脂22とフィルタ23が密着し、隙間がないようにされている。

【0054】フィルタ23とカラムキャップ25の間には、ザグリ状の隙間であるフィルタスペース27が形成されており、このフィルタスペース27は、液の流れの分散をよくするために形成されている。フィルタスペース27を設けることにより、フィルタ23の内部でも分離した成分の流れを、垂直かつ平行に導くため、分解能の低下を防げるものである。

【0055】カラムキャップ25に設けられた接続孔26には、ミキサが接続される。

【0056】本実施例において、特徴的なところは、分離カラム10の構成にある。例えば、第1の例においては、分離カラム10のサイズは、内径(ID)6.0mmであり、長さは、40mmとしている。

【0057】このような分離カラムのサイズとした理由について、以下に説明する。

【0058】上述したように、従来の分離カラム(4.6mm ID×60mm)にあつては、分析時間を速める目的で緩衝液流速を上げていくと、カラム負荷圧力が増加し、カラム負荷圧力と緩衝液流速の関係が直線関係から外れることが判明した。この直線関係から外れるところの、分離カラムの使用限界流速は、実験的には、0.6ml/minであることが判明した。この流速以上の速度で緩衝液を流せば、分析時間は短縮可能であるが、カラム負荷圧力が高くなりすぎるため、実際の使用には耐えられないものとなる。

【0059】ここで、発明者は、この時の緩衝液の線速

度に着目した訳である。その理由としては、実験的に、内径4.6mmで長さが40mmの分離カラムを使用したところ、長さが短くなったことにより、分離カラムの圧力は低下するので、限界流速も早くなると考えたが、分離カラムの使用限界流速は、長さが変わったにも拘らず、0.6ml/minと同じであった。

【0060】緩衝液流速が、0.6ml/minの時の、この緩衝液の線速度は、36mm/minである。即ち、分離カラムの使用限界は、緩衝液の流速ではなく、線速度によって規定され、その使用限界線速度は、36mm/minと考えられる。従って、この使用限界線速度を越えることなく、緩衝液流速を速めるという観点で、分離カラムの内径を4.6mmから6.0mmに増大している。

【0061】この分離カラムの内径を大きくすることにより、緩衝液流速を速めることができ、分析時間は短縮できる。

【0062】また、この時、カラム効率を高めるため、イオン交換樹脂の粒径を、従来と同様に3 $\mu$ mとしておくと、粒径が小さいため、カラムの圧力損失が大きくなる。そこで、この圧力損失を小さくするために、分離カラムの全長を、従来の60mmから40mmへと短くしている、カラム長が短くなると、理論段数が減るため、カラム外広がり分離に影響するが、これは、カラム外広がりの80%に寄与する反応コイルにおける広がりを押さえることによって解決できるものである。

【0063】このような考え方に基づいて、内径6mmで長さ40mmの分離カラムを用いて、緩衝液流速とカラム圧力の関係について調べたところ、図3のような関係があることが判明した。

【0064】図5は、本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置において、内径6mmで長さ40mmで、充填されるイオン交換樹脂の粒径が3 $\mu$ mの分離カラムを用いた場合の緩衝液流速とカラム圧力の関係を示す図である。

【0065】図5において、横軸は、分離カラムを流れる緩衝液流速(ml/min)及びこの流速に対応する緩衝液線速度(mm/min)を表し、縦軸は、分離カラムの負荷圧力(kgf/cm<sup>2</sup>)を示している。

【0066】緩衝液流速が0.2ml/min (線速度 40

7mm/min)の時の分離カラムの負荷圧力は、19kgf/cm<sup>2</sup>である。緩衝液流速が0.4ml/min (線速度14mm/min)の時の分離カラムの負荷圧力は、39kgf/cm<sup>2</sup>である。緩衝液流速が0.6ml/min (線速度21mm/min)の時の分離カラムの負荷圧力は、58kgf/cm<sup>2</sup>である。緩衝液流速が0.8ml/min (線速度28mm/min)の時の分離カラムの負荷圧力は、78kgf/cm<sup>2</sup>である。緩衝液流速が1.0ml/min (線速度35mm/min)の時の分離カラムの負荷圧力は、98kgf/cm<sup>2</sup>である。

【0067】即ち、緩衝液流速が1.0ml/min (線速度35mm/min)までは、緩衝液流速(線速度)と分離カラム負荷圧力との関係は直線関係にあることが理解される。

【0068】また、上述したように、使用限界線速度は、36mm/minであることからして、緩衝液流速が1.0ml/min (線速度35mm/min)まで緩衝液流速を高めても、負荷圧力は、100kgf/cm<sup>2</sup>以下であることから、負荷圧力の観点からは十分に使用に耐え得ることが判明した。

【0069】ここで、問題となるのは、このようにして、緩衝液流速を高めて分析時間を短縮した場合の分離率の点であるので、以下のようにして実施をした。この例では、分析時間20分に分析時間を短縮した場合の標準分析法について実施した。

【0070】この実施に当たり、分析装置本体としては、L-8500形日立高速アミノ酸分析計を用いている。分離カラムには、日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCを用いている。この日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCの粒径は、3 $\mu$ mである。また、アンモニアフィルタカラム8としては、日立カスタムイオン交換樹脂#2650Lを用いた。反応コイルとしては内径0.25mm ID×7mのテフロンチューブを用いた。

【0071】また、この分析の条件は、表1に示すとおりである。なお、表1には、対比する意味で、従来の標準法で30分分析の分析条件を示してある。

【0072】

【表1】

表1 標準分析法の分析条件

項目	従来法	実施例1
分析時間(正味時間)	30 分	20 分
カラムサイズ	4.6 mmID × 60 mm	6.0 mmID × 40 mm
イオン交換樹脂粒径	3 μm	3 μm
緩衝液流速	0.46 ml/min	0.78 ml/min
カラム線速度	28 mm/min	27 mm/min
カラム圧力	110 kgf/cm <sup>2</sup>	80 kgf/cm <sup>2</sup>
ニンヒドリン流速	0.35 ml/min	0.60 ml/min
反応コイルサイズ	0.25 mm × 7 m	0.25 mm × 7 m
反応コイル線速度	16.5 m/min	28.2 m/min
反応時間	0.42 分	0.25 分

【0073】即ち、分離カラムのカラムサイズは、上述したように、内径6.0mmで長さが40mmとしてある。即ち、従来の30分分析のものよりも内径が大きく、全長が短くなっている。また、このようなサイズの分離カラムにあって、分離カラムの長さL1と内径Rの比(L1/R)は、6.6であり、L1/Rが10以下となっている。

【0074】また、標準法で20分分析を可能とするため、緩衝液流速は、0.78ml/minとしてある。この流速は、従来の30分分析法の場合の緩衝液流速(0.46ml/min)の(30/20)倍よりも僅かに速いものとなっている。しかしながら、緩衝液のカラム線速度の点では、本例の20分分析法においては、27mm/minであり、これは、従来の30分分析法の28mm/minとほぼ同程度である。カラム線速度が殆ど変わらないにも拘らず、分離カラムの内径を大きくしたことにより、緩衝液流速を速めることができ、分析時間を短縮できている。

【0075】また、カラム線速度が殆ど変わらないにも拘らず、分離カラムの内径を大きくしたことにより、分離カラムの負荷圧力は、80kgf/cm<sup>2</sup>となり、従来の30分分析法における分離カラム負荷圧力110kgf/cm<sup>2</sup>より低下することができる。従って、使用限界負荷圧力を同じとするならば、本例の方が、分離カラムの寿命を長寿命化できるものとなる。

【0076】緩衝液流速が0.78ml/minと速まったのに応じて、ニンヒドリン試薬の流速は、0.60ml/minに速めてある。

【0077】次は、反応コイル関係であるが、反応コイル自体のサイズは、内径0.25mmで、長さ7mのものを使用している。これは、上述したように、内径を0.25mm以下で、長さを10m以下にするという条件の下で選択されている。反応コイルそのもののサイズ

は、従来の30分分析のものと同じであるが、反応コイルを流れる液の総量は、即ち、緩衝液とニンヒドリン試薬の流量を加算したものは、1.38ml/minとなっており、1.0ml/min以上の条件を満たしている。なお、従来の30分分析においては、液の総量は、0.81ml/minである。

【0078】また、反応コイルには、緩衝液とニンヒドリン試薬の混合液が流れるため、緩衝液及びニンヒドリン試薬の流速が高まった結果、これらの混合液の流速も高まり、反応コイルにおける混合液の線速度は、16.5m/minから28.2m/minに速まっており、20m/min以上の条件を満たすものとなっている。

【0079】また、 $(r^4 \cdot L2/f)$ の値も、 $1.24 \times 10^{-3} \text{ (mm}^4 \cdot \text{m / (ml/min))}$ となり、 $2.5 \times 10^{-3}$ 以下の要件を満たしている。この時の拡がり $\sigma^*$ は、0.047(min) (=2.8(s))となり、0.067(min) (=4(s))以下の要件を満たしている。

【0080】反応コイルのサイズは同じであり、混合液の線速度が速まった結果、反応時間は、従来の30分分析法の0.42分から0.25分に短縮している。その結果として、感度が多少低下することになるが、この感度低下は実用上は問題ないものであり、この標準20分分析のクロマトグラムを用いて後述する。

【0081】以上説明したようにして、標準20分分析が可能となるが、そのとき着目すべき点に、分離率がある。分析時間が速まっても分離率が低下すれば、実用的でないが、以下に説明するように、本例においては、十分な分離率が得られている。

【0082】次に、本例による標準20分分析に用いた緩衝液の組成について、表2を用いて説明する。

【0083】

【表2】

表2 標準分析法用緩衝液の組成

名 称	PH-1	PH-2	PH-3	PH-4	RH-RG
緩衝液NO.	1	2	3	4	5
Na濃度(N)	0.08	0.2	0.2	1.2	0.2
1. 蒸留水(約)	700 ml	700 ml	700 ml	700 ml	700 ml
2. クエン酸ナトリウム(2H <sub>2</sub> O)	3.10 g	7.74 g	13.31 g	26.67 g	—
3. 水酸化ナトリウム	—	—	—	—	8.00 g
4. 塩化ナトリウム	2.83 g	7.07 g	3.74 g	54.35 g	—
5. クエン酸(H <sub>2</sub> O)	9.90 g	22.00 g	12.80 g	6.10 g	—
6. エチルアルコール	150.0 ml	20.0 ml	4.0 ml	—	100.0 ml
7. ベンジルアルコール	—	—	—	5.0 ml	—
8. チオジグリコール	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml	—	—
9. BRIJ-35 *	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
10. pH(公称値)	3.3	3.2	4.0	4.9	—
11. 全量(計量する)	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
12. カプリル酸	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

【0084】表2において、PH-1は、第1緩衝液の組成を表し、PH-2は、第2緩衝液の組成を表し、PH-3は、第3緩衝液の組成を表し、PH-4は、第4緩衝液の組成を表しており、RH-RGは、カラム再生液の組成を表している。

【0085】第1緩衝液PH-1は、Na濃度が0.08Nであり、蒸留水約700mlに対して、クエン酸ナトリウム(2H<sub>2</sub>O)を3.10g、塩化ナトリウム2.83g、クエン酸(H<sub>2</sub>O)を9.90g、エチルアルコールを150.0ml、チオジグリコールを5.0ml、BRIJ-35を4.0ml、カプリル酸0.1mlを溶解し、さらに、蒸留水を加えることによって、全量を1.0l(1000ml)としている。この第1緩衝液PH-1のpHは、3.3(公称値)である。

【0086】第2緩衝液PH-2及び第3緩衝液PH-3は、第1緩衝液PH-1と同じ組成を有しているが、その組成比を表2に示すように変えたものである。従って、第2緩衝液PH-2のナトリウム濃度は0.2であ

り、pHは、3.2である。また、第3緩衝液PH-3のナトリウム濃度は0.2であり、pHは、4.0である。

【0087】第4緩衝液PH-4は、第1～第3緩衝液のエチルアルコール及びチオジグリコールに代えて、ベンジルアルコールを使用しており、その組成比を表2に示すとおりである。第4緩衝液PH-4のナトリウム濃度は1.2であり、pHは、4.9である。

【0088】再生液RH-RGは、Na濃度が0.2であり、蒸留水約700mlに対して、水酸化ナトリウムを8.00g、エチルアルコールを100.0ml、BRIJ-35を4.0ml、カプリル酸0.1mlを溶解し、さらに、蒸留水を加えることによって、全量を1.0l(1000ml)としている。

【0089】次に、本例による標準20分分析の緩衝液の切替タイミングと各緩衝液の選択を示す分析プログラムについて、表3を用いて説明する。

【0090】

【表3】

表3 分析プログラム

STEP	TIME (min)	BUFFER (TOTAL 100%)					COLUMN TEMP
		V1	V2	V3	V4	V5	
1	0.0	100	—	—	—	—	55
2	2.0	100	—	—	—	—	
3	2.1	—	90	10	—	—	
4	4.5	—	90	10	—	—	
5	4.6	—	—	100	—	—	
6	10.0	—	—	100	—	—	
7	10.1	—	—	—	100	—	
8	17.5	—	—	—	100	—	
9	17.6	—	—	—	—	100	
10	21.0	—	—	—	—	100	
11	21.1	—	100	—	—	—	
12	22.0	—	100	—	—	—	
13	22.1	100	—	—	—	—	
14	33.0	100	—	—	—	—	

【0091】表3において、左からステップ番号、各ステップの実行時間（分）、緩衝液の流量、分離カラムの温度（℃）を表している。ステップ1～2、即ち、0.0分から2.0分までは、第1緩衝液を流す電磁弁V1

20

を駆動して、第1緩衝液を100%流す。この時の分離カラムの温度は、55℃に温度制御されている。  
【0092】ステップ3～4、即ち、2.1分から4.5分までは、第2緩衝液を流す電磁弁V2及び第3緩衝液を流す電磁弁V3を駆動して、第2緩衝液90%：第3緩衝液10%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流す。電磁弁V2、V3の駆動は、パルス幅変調により行われるため、電磁弁V2の導通角を90%として、電磁弁V3の導通角を10%とし、電磁弁V2が開くタイミングで、電磁弁V3を閉じ、また、逆に、電磁弁V2を閉じるタイミングで、電磁弁V3を開くことにより、流量比の制御が行える。この時の分離カラムの温度も、55℃に温度制御されている。なお、分離カラムの温度は、この後も55℃に制御される。ステップ2とステップ3の間においては、第1緩衝液100%の状態から、第2緩衝液90%で第3緩衝液10%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

30

【0093】ステップ5～6、即ち、4.6分から10.0分までは、第3緩衝液を流す電磁弁V3を駆動して、第3緩衝液を100%流す。ステップ4とステップ5の間においては、第2緩衝液90%で第3緩衝液10%の状態から、第3緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

40

【0094】ステップ7～8、即ち、10.1分から17.5分までは、第4緩衝液を流す電磁弁V4を駆動して、第4緩衝液を100%流す。ステップ6とステップ7の間においては、第3緩衝液100%の状態から第4緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

【0095】ステップ9～10、即ち、17.6分から

50

21.0分までは、再生液を流す電磁弁V5を駆動して、再生液を100%流す。ステップ8とステップ9の間においては、第4緩衝液100%の状態から再生液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。なお、分析時間は、20分であるが、分離カラムの遅れを考慮して、再生液は、17.6分から送液するようにしている。

【0096】ステップ11～12、即ち、21.1分から22.0分までは、再度、第2緩衝液を流す電磁弁V2を駆動して、第2緩衝液を100%流す。ステップ10とステップ11の間においては、再生液100%の状態から第2緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。ここで、第2緩衝液は、電磁バルブの下流に滞留する物質を洗浄するために、使用されている。

【0097】ステップ13～14、即ち、22.1分から33.0分までは、再度、第1緩衝液を流す電磁弁V1を駆動して、第1緩衝液を100%流す。ステップ12とステップ13の間においては、第2緩衝液100%の状態から第1緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。ここで、第1緩衝液は、次の測定に備えて、流路系を第1緩衝液で満たし、カラム内を平衡化するために使用される。

【0098】次に、図6を用いて、本実施例により標準試料中に含まれる蛋白加水分解物アミノ酸18成分を分析したクロマトグラムを示すとともに、図7には、同一の標準試料について、従来の標準30分分析法を用いて分析したときのクロマトグラムを示す。図6及び図7の横軸は、それぞれ、時間（min）を示している。

【0099】図6から明らかなように、18成分の分析が、20分で終了している。また、図7に示す従来の標準30分分析法では、分析に30分を要している。即ち、本実施例では、標準法によって20分の高速で、18成分の分析を可能としている。

【0100】図6及び図7を比較すると明かなように、Asp（アスパラギン酸）～Ala（アラニン）の間では、本実施例の方がクロマトピークの優れた分離を示している。クロマトグラムの分離の程度を図る指標としては、一般に、Thr（スレオニン）～Ser（セリン）の分離率や、Gly（グリシン）～Ala（アラニン）の分離率が用いられている。これらの分離率に基づいて、図5と図6に示される分離率を計算により求めて見ると、表4に示すようになる。

【0101】

【表4】

表4 標準分析法の分離率の比較

	従来法 30分法	実施例1 20分法	実施例2 20分法	実施例3 20分法
Thr-Ser	89 %	99 %	91 %	90 %
Gly-Ala	95 %	100 %	99 %	98 %

【0102】図7に示す従来の標準30分分析法では、Thr（スレオニン）～Ser（セリン）の分離率は、89 %であるのに対して、本実施例では、その分離率は99 %に向上している。また、Gly（グリシン）～Ala（アラニン）の分離率は、従来の標準30分分析法では、95 %であるのに対して、本実施例では、その分離率は100 %に向上している。

【0103】即ち、図6と図7の対比から明かなように、本実施例では、標準分析を20分の高速化でき、しかも、分離率を従来の標準30分分析の場合よりも、向上させることができる。

【0104】なお、表4における実施例2については、後述する。

【0105】また、図6の実施例の方が、クロマトピークの高さは、若干低くなっている。これは、表1に示したように、緩衝液流速及びニンヒドリン試薬流速が増加\*

表5 標準分析法の分析条件

項 目	実施例2	実施例3
分析時間(正味時間)	20 分	20 分
カラムサイズ	6.0 mmID × 30 mm	5.0 mmID × 50 mm
イオン交換樹脂粒径	3 μm	3 μm
緩衝液流速	0.59 ml/min	0.68 ml/min
カラム線速度	21 mm/min	35 mm/min
カラム圧力	50 kgf/cm <sup>2</sup>	110 kgf/cm <sup>2</sup>
ニンヒドリン流速	0.50 ml/min	0.55 ml/min
反応コイルサイズ	0.25 mm × 7 m	0.25 mm × 7 m
反応コイル線速度	22.3 m/min	25.2 m/min
反応時間	0.33 分	0.29 分

【0114】即ち、分離カラムのカラムサイズは、上述したように、内径6.0 mmで長さが30 mmとしてあ

\*したことにより、反応コイルを流れる混合液の線速度が増加し、従って、反応時間が従来の0.42分から0.25分に短縮した影響である。しかしながら、分析したアミノ酸成分の定量には、クロマトピークの面積法を採用するため、ピークの高さの減少の影響は少なく、むしろ、クロマトピークの高さが向上したことにより、2つのピークを分離して面積をそれぞれに、より正確に求められることから測定精度の低下は見られないものである。

10 【0106】以上述べた本実施例によれば、従来は、不可能であった標準法による20分分析が可能となった。

【0107】また、この際、分離率も従来の30分標準法分析に比べて向上している。

【0108】また、分離カラムの圧力も従来の30分標準法分析に比べて低いため、長寿命化が図れる。

【0109】次に、本発明の第2の実施例について説明する。この例も標準法で20分分析を可能とするものである。

20 【0110】本例においても、図3に示した構成のアミノ酸分析装置を用い、分離カラムの構造も図4に示したものをを用いている。

【0111】分析装置本体としては、L-8500形日立高速アミノ酸分析計を用いている。分離カラムには、日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCを用いている。この日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCの粒径は、3 μmである。また、アンモニアフィルタカラム8としては、日立カスタムイオン交換樹脂#2650Lを用いた。

30 【0112】また、この分析の条件は、表5に示すとおりである。

【0113】

【表5】

る。即ち、実施例1と同じ内径であるが、長さの短いものを使用している。また、このようなサイズの分離カラ

ムにあって、分離カラムの長さL1と内径Rの比(L1/R)は、5.0であり、L1/Rが1.0以下となっている。

【0115】また、標準法で20分分析を可能とするため、緩衝液流速は、0.59ml/minとしてある。この流速は、実施例1に比べて、約3/4となっており、分離カラムの長さが短くなった分、流速を低くしているが、従来例の0.46ml/minより早くすることにより、分析時間を短縮できている。また、緩衝液のカラム線速度については、上述したように、使用限界線速度は、36mm/minであることから、本実施例の21mm/minは、この使用限界線速度以内の値である。

【0116】また、実施例1に比べて、カラム線速度が低くなった結果、分離カラムの負荷圧力は、50kgf/cm<sup>2</sup>となり、実施例1の20分分析法に比べては、低くできる。従って、使用限界負荷圧力を同じとするならば、本例の方が、分離カラムの寿命を長寿命化できるものとなる。

【0117】次に、反応コイル自体のサイズは、内径0.25mmで、長さ7mのものを使用している。反応コイルを流れる液の総量は、1.09ml/minとなっており、1.0ml/min以上の条件を満たしている。

【0118】また、反応コイルには、緩衝液とニンヒドリン試薬の混合液が流れるため、反応コイルにおける混合液の線速度は、22.3m/minとなっており、20m/min以上の条件を満たすものとなっている。

【0119】また、 $(r^4 \cdot L2/f)$ の値も、 $1.57 \times 10^{-3}$  (mm<sup>4</sup>・m/(ml/min))となり、 $2.5 \times 10^{-3}$ 以下の要件を満たしている。この時の拡がり $\sigma^*$ は、0.054 (min) (=3.2 (s))となり、0.067 (min) (=4 (s))以下の要件を満たしている。

【0120】反応コイルのサイズは同じであり、混合液の線速度が低下した結果、反応時間は、実施例1の0.25分から0.33分に伸びている。その結果として、感度が多少増加することになる。

【0121】以上説明したようにして、標準20分分析が可能となるが、そのとき着目すべき点に、分離率がある。分析時間が速まっても分離率が低下すれば、実用的でないが、以下に説明するように、本例においては、十分な分離率が得られている。

【0122】次に、本例による標準20分分析に用いた緩衝液の組成は、実施例1に用いたものと同じであり、表2において説明したものと同一緩衝液及び再生液を使用している。

【0123】次に、本例による標準20分分析の緩衝液の切替タイミングと各緩衝液の選択を示す分析プログラムについては、実施例1に用いたものと同じであり、表

3において説明したものと同一分析プログラムを使用している。

【0124】以上のようにして、クロマトグラムを求め、分離率を計算により求めて見ると、上述表4に示すようになる。

【0125】即ち、図6に示す従来の標準30分分析法では、Thr (スレオニン) - Ser (セリン) の分離率は、89%であるのに対して、本実施例では、その分離率は91%に向上している。また、Gly (グリシン) - Ala (アラニン) の分離率は、従来の標準30分分析法では、95%であるのに対して、本実施例では、その分離率は99%に向上している。

【0126】即ち、本実施例では、標準分析を20分の高速化でき、しかも、分離率を従来の標準30分分析の場合よりも、向上させることができる。

【0127】なお、表4における比較から明らかなように、実施例1の標準20分分析法では、Thr (スレオニン) - Ser (セリン) の分離率は、99%まで向上したのに対して、本実施例では、その分離率は91%であり、また、Gly (グリシン) - Ala (アラニン) の分離率は、実施例1の標準20分分析法では、100%であるのに対して、本実施例では、その分離率は99%であり、実施例1に比べて本実施例の分離率の低下が見られる。

【0128】これは、緩衝液流速を遅くした影響であり、多少の分離率の低下は見られるものの従来に比べて高い分離率を示している。

【0129】以上述べた本実施例によれば、従来は、不可能であった標準法による20分分析が可能となった。

【0130】また、この際、分離率も従来の30分標準法分析に比べて向上している。

【0131】また、分離カラムの圧力も従来の30分標準法分析に比べて低いため、長寿命化が図れる。

【0132】次に、本発明の第3の実施例について説明する。本例は、標準法で20分分析を可能とするものである。

【0133】本例においても、図3に示した構成のアミノ酸分析装置を用い、分離カラムの構造も図4に示したものをを用いている。

【0134】分析装置本体としては、L-8500形日立高速アミノ酸分析計を用いている。分離カラムには、日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCを用いている。この日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCの粒径は、3 $\mu$ mである。また、アンモニアフィルタカラム8としては、日立カスタムイオン交換樹脂#2650Lを用いた。

【0135】また、この分析の条件は、表5に示すとおりである。即ち、分離カラムのカラムサイズは、上述したように、内径5.0mmで長さが50mmとしてある。即ち、実施例1と比較して、内径は細くし、長さを

21

長くしている。また、このようなサイズの分離カラムにあって、分離カラムの長さ $L_1$ と内径 $R$ の比( $L_1/R$ )は、10.0であり、 $L_1/R$ が10以下となっている。

【0136】また、標準法で20分分析を可能とするため、緩衝液流速は、0.68ml/minとしてある。また、この時、緩衝液のカラム線速度は、35mm/minとなっており、使用限界線速度は、36mm/minであることから、本実施例の35mm/minは、この使用限界線速度以内の値である。即ち、この例では、使用限界線速度の限度内となるように、緩衝液流速を設定してある。

【0137】また、実施例1に比べて、カラム線速度が速くなった結果、分離カラムの負荷圧力は、110kgf/cm<sup>2</sup>となり、実施例1の20分分析法に比べては、高くなるが、従来例の負荷圧力と同じであり、従来と同等の寿命を得ることができる。

【0138】次に、反応コイル自体のサイズは、内径0.25mmで、長さ7mのものを使用している。反応コイルを流れる液の総量は、1.23ml/minとなっており、1.0ml/min以上の条件を満たしている。

【0139】また、反応コイルには、緩衝液とニンヒドリン試薬の混合液が流れるため、反応コイルにおける混合液の線速度は、25.2m/minとなっており、20m/min以上の条件を満たすものとなっている。

【0140】また、( $r^4 \cdot L_2 / f$ )の値も、 $1.39 \times 10^{-3}$  (mm<sup>4</sup>・m/(ml/min))となり、 $2.5 \times 10^{-3}$ 以下の要件を満たしている。この時の拡がり $\sigma^*$ は、0.050(min)(=3.0(s))となり、0.067(min)(=4(s))以下の要件を満たしている。

【0141】反応コイルのサイズは同じであり、混合液の線速度が低下した結果、反応時間は、実施例1の0.25分から0.29分に伸びている。その結果として、感度が多少増加することになる。

【0142】以上説明したようにして、標準20分分析が可能となるが、そのとき着目すべき点に、分離率がある。分析時間が速まっても分離率が低下すれば、実用的でないが、以下に説明するように、本例においては、十分な分離率が得られている。

【0143】次に、本例による標準20分分析に用いた緩衝液の組成は、実施例1に用いたものと同じであり、表2において説明したのと同じ緩衝液及び再生液を使用している。

【0144】次に、本例による標準20分分析の緩衝液の切替タイミングと各緩衝液の選択を示す分析プログラムについては、実施例1に用いたものと同じであり、表3において説明したのと同じ分析プログラムを使用している。

22

【0145】以上のようにして、クロマトグラムを求め、分離率を計算により求めて見ると、上述表4に示すようになる。

【0146】即ち、図6に示す従来の標準30分分析法では、Thr(スレオニン)-Ser(セリン)の分離率は、89%であるのに対して、本実施例では、その分離率は90%に向上している。また、Gly(グリシン)-Ala(アラニン)の分離率は、従来の標準30分分析法では、95%であるのに対して、本実施例では、その分離率は98%に向上している。

【0147】即ち、本実施例では、標準分析を20分の高速化でき、しかも、分離率を従来の標準30分分析の場合よりも、向上させることができる。

【0148】なお、表4における比較から明らかなように、実施例1の標準20分分析法では、Thr(スレオニン)-Ser(セリン)の分離率は、99%まで向上したのに対して、本実施例では、その分離率は90%であり、また、Gly(グリシン)-Ala(アラニン)の分離率は、実施例1の標準20分分析法では、100%であるのに対して、本実施例では、その分離率は98%であり、実施例1に比べて本実施例の分離率の低下が見られる。

【0149】これは、緩衝液流速を遅くした影響であり、多少の分離率の低下は見られるものの従来に比べて高い分離率を示している。

【0150】以上述べた本実施例によれば、従来は、不可能であった標準法による20分分析が可能となった。

【0151】また、この際、分離率も従来の30分標準法分析に比べて向上している。

【0152】また、分離カラムの圧力も従来の30分標準法分析と同等であり、同様の寿命を得ることができる。

【0153】次に、本発明の第4の実施例二付いて説明する。この例は、標準法で15分分析を可能とするものである。

【0154】本例においても、図3に示した構成のアミノ酸分析装置を用い、分離カラムの構造も図4に示したものをを用いている。

【0155】分析装置本体としては、L-8500形日立高速アミノ酸分析計を用いている。分離カラムには、日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCを用いている。この日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCの粒径は、3μmである。また、アンモニアフィルタカラム8としては、日立カスタムイオン交換樹脂#2650Lを用いた。

【0156】また、この分析の条件は、表5に示すとおりである。なお、表5には、対比する意味で、実施例1で示した標準法で20分分析の分析条件を示してある。

【0157】

【表6】

表6 標準分析法の分析条件

項 目	実施例4	実施例1
分析時間(正味時間)	15 分	20 分
カラムサイズ	6.0 mmID × 60 m	6.0 mmID × 40 mm
イオン交換樹脂粒径	3 μm	3 μm
緩衝液流速	0.97 ml/min	0.78 ml/min
カラム線速度	35 mm/min	27 mm/min
カラム圧力	100 kgf/cm <sup>2</sup>	80 kgf/cm <sup>2</sup>
ニンヒドリン流速	0.80 ml/min	0.60 ml/min
反応コイルサイズ	0.25 mm × 7 m	0.25 mm × 7 m
反応コイル線速度	35.1 m/min	28.2 m/min
反応時間	0.19 分	0.25 分

【0158】即ち、分離カラムのカラムサイズは、上述したように、内径6.0mmで長さが40mmとしてある。即ち、実施例1と同じサイズのものである。また、このようなサイズの実験カラムにあって、分離カラムの長さL1と内径Rの比(L1/R)は、6.6であり、L 20 1/Rが10以下となっている。

【0159】また、標準法で15分分析を可能とするため、緩衝液流速は、0.97ml/minとしてある。この流速は、実施例1の20分分析法の場合の緩衝液流速(0.78ml/min)の(20/15)倍よりも僅かに遅いものとなっている。緩衝液のカラム線速度の点では、本例の15分分析法においては、35mm/minであり、これは、従来の30分分析法の28mm/minよりも速くなっているが、分離カラムの内径も大きくしたことにより、緩衝液流速を速めることができ、 30 分析時間を短縮できている。また、緩衝液のカラム線速度については、上述したように、使用限界線速度は、36mm/minであることから、本実施例の35mm/minは、この使用限界線速度以内の値である。

【0160】また、実施例1に比べて、カラム線速度が高まった結果、分離カラムの負荷圧力は、100kgf/cm<sup>2</sup>となり、20分分析法に比べては、高いものとなっているが、従来の30分分析法における分離カラム負荷圧力110kgf/cm<sup>2</sup>より低下することができる。従って、使用限界負荷圧力を同じとするならば、本 40 例の方が、分離カラムの寿命を長寿化できるものとなる。

【0161】緩衝液流速が0.97ml/minと速まったのに応じて、ニンヒドリン試薬の流速は、0.80ml/minに速めてある。

【0162】次に、反応コイル自体のサイズは、内径0.25mmで、長さ7mのものを使用している。反応コイルを流れる液の総量は、1.77ml/minとなっており、1.0ml/min以上の条件を満たしている。

【0163】また、反応コイルには、緩衝液とニンヒドリン試薬の混合液が流れるため、緩衝液及びニンヒドリン試薬の流速が高まった結果、これらの混合液の流速も高まり、反応コイルにおける混合液の線速度は、35.1m/minとなっており、20m/min以上の条件を満たすものとなっている。

【0164】また、 $(r^4 \cdot L2/f)$ の値も、 $9.66 \times 10^{-4} \text{ (mm}^4 \cdot \text{m / (ml/min))}$ となり、 $2.5 \times 10^{-3}$ 以下の要件を満たしている。この時の拡がり $\sigma^*$ は、0.042(min) (=2.5(s))となり、0.067(min) (=4(s))以下の要件を満たしている。

【0165】反応コイルのサイズは同じであり、混合液の線速度が速まった結果、反応時間は、実施例1の0.25分から0.19分に短縮している。その結果として、感度が多少低下することになるが、この感度低下は実用上は問題ないものであり、この標準15分分析のクロマトグラムを用いて後述する。

【0166】以上説明したようにして、標準15分分析が可能となるが、そのとき着目すべき点に、分離率がある。分析時間が速まっても分離率が低下すれば、実用的でないが、以下に説明するように、本例においては、十分な分離率が得られている。

【0167】次に、本例による標準15分分析に用いた緩衝液の組成は、実施例1に用いたものと同じであり、表2において説明したものと同一緩衝液及び再生液を使用している。

【0168】次に、本例による標準15分分析の緩衝液の切替タイミングと各緩衝液の選択を示す分析プログラムについては、実施例1に用いたものと同じであり、表3において説明したものと同一分析プログラムを使用している。

【0169】次に、図8を用いて、本実施例により標準試料中に含まれる蛋白加水分解物アミノ酸18成分を分 50 析したクロマトグラムを示す。

【0170】図8の横軸は、時間を示しており、この時間軸スケールは、図5に示した実施例1と同じである。

【0171】図8から明らかなように、18成分の分析が、15分で終了している。即ち、本実施例では、標準法によって15分の高速で、18成分の分析を可能としている。

【0172】図8及び従来例の図7を比較すると明らかなように、Asp（アスパラギン酸）-Ala（アラニン）の間では、本実施例の方がクロマトピークの優れた分離を示している。クロマトグラムの分離の程度を図る指標としては、一般に、Thr（スレオニン）-Ser（セリン）の分離率や、Gly（グリシン）-Ala（アラニン）の分離率が用いられている。これらの分離率に基づいて、図7に示される分離率を計算により求めて見ると、表7に示すようになる。

【0173】

【表7】

表7 標準分析法の分離率の比較

	従来法 30分法	実施例1 20分法	実施例4 15分法
Thr-Ser	89 %	99 %	93 %
Gly-Ala	95 %	100 %	97 %

【0174】即ち、図6に示す従来の標準30分分析法では、Thr（スレオニン）-Ser（セリン）の分離率は、89%であるのに対して、本実施例では、その分離率は93%に向上している。また、Gly（グリシン）-Ala（アラニン）の分離率は、従来の標準30分分析法では、95%であるのに対して、本実施例では、その分離率は97%に向上している。

【0175】即ち、図8と図7の対比から明かなように、本実施例では、標準分析を15分の高速化でき、しかも、分離率を従来の標準30分分析の場合よりも、向上させることができる。

【0176】なお、表7における比較から明かなように、実施例1の標準20分分析法では、Thr（スレオニン）-Ser（セリン）の分離率は、99%まで向上したのに対して、本実施例では、その分離率は93%であり、また、Gly（グリシン）-Ala（アラニン）

の分離率は、実施例1の標準20分分析法では、100%であるのに対して、本実施例では、その分離率は97%であり、実施例1に比べて本実施例の分離率の低下が見られる。

【0177】これは、緩衝液流速をさらに速くした影響であり、多少の分離率の低下は見られるものの従来に比べて高い分離率を示している。

【0178】また、図8と図6を比較してみると、図8の実施例のクロマトピークの高さの方が、図6の実施例のクロマトピークの高さより高くなっているが、これは、時間軸が20分から15分に圧縮されたためであり、クロマトピークの面積法を用いて定量する際には、図6より多少定量精度が低下するが、従来の標準30分分析法より低下することはない。

【0179】以上述べた本実施例によれば、従来は、不可能であった標準法による15分分析が可能となった。

【0180】また、この際、分離率も従来の30分標準法分析に比べて向上している。

【0181】また、分離カラムの圧力も従来の30分標準法分析に比べて低いため、長寿命化が図れる。

【0182】次に、本発明の第5の実施例について説明する。本例は、生体液法に適用して、生体液法で60分分析を可能とするものである。

【0183】本実施例においても、図3に示した構成のアミノ酸分析装置を用い、分離カラムの構造も図4に示したものをを用いている。

【0184】分析装置本体としては、L-8500形日立高速アミノ酸分析計を用いている。分離カラムには、日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCを用いている。この日立カスタムイオン交換樹脂#2622-SCの粒径は、3 $\mu$ mである。また、アンモニアフィルタカラム8としては、日立カスタムイオン交換樹脂#2650Lを用いている。

【0185】また、この分析の条件は、表8に示すとおりである。なお、表8には、対比する意味で、従来の生体液法で110分分析の分析条件を示してある。

【0186】

【表8】

表8 生体液分析法の分析条件

項 目	従来法	実施例5
分析時間	120 分	60 分
カラムサイズ	4.6 mmID × 60 mm	6.0 mmID × 40 mm
イオン交換樹脂粒径	3 μm	3 μm
緩衝液流速	0.35 ml/min	0.78 ml/min
カラム線速度	21 mm/min	27 mm/min
カラム圧力	100 kgf/cm <sup>2</sup>	110 kgf/cm <sup>2</sup>
ニンヒドリン流速	0.30 ml/min	0.60 ml/min
反応コイルサイズ	0.25 mmID × 7 m	0.25 mmID × 7 m
反応コイル線速度	13.3 m/min	28.2 m/min
反応時間	0.53 分	0.25 分

【0187】即ち、分離カラムのカラムサイズは、上述したように、内径6.0mmで長さが40mmとしてある。即ち、従来の110分分析のものよりも内径が大きく、全長が短くなっている。また、実施例1と同じサイズのものである。また、このようなサイズの分離カラム

【0188】また、生体液法で60分分析を可能とするため、緩衝液流速は、0.78ml/minとしてある。この流速は、従来の110分分析法の場合の緩衝液流速(0.35ml/min)の(110/60)倍よりも僅かに速いものとなっている。この流速は、実施例1の標準20分法と同じである。緩衝液のカラム線速度の点では、生体液60分分析法においては、27mm/minであり、これは、従来の110分分析法の21mm/minより僅かに速い速度であるが、分離カラムの内径も大きくしたことにより、緩衝液流速を速めることができ、分析時間を短縮できている。また、緩衝液のカラム線速度については、上述したように、使用限界線速度は、36mm/minであることから、本実施例の27mm/minは、この使用限界線速度以内の値である。

【0189】また、カラム線速度は増加したが、分離カラムの内径も大きくしたことにより、分離カラムの負荷圧力は、110kgf/cm<sup>2</sup>となり、従来の110分分析法における分離カラム負荷圧力100kgf/cm<sup>2</sup>より僅かに高くなっているが、流速の増加に比べて分離カラム負荷圧力の増加の程度は押さえられている。また、この程度の圧力増加であれば、分離カラムの寿命に対する影響もさほど小さくなくて済むものである。

【0190】緩衝液流速が0.78ml/minと速ま

ったのに応じて、ニンヒドリン試薬の流速は、0.60ml/minに速めてある。

【0191】次は、反応コイルのサイズは、内径0.25mmで、長さ7mのものを使用している。反応コイルには、緩衝液とニンヒドリン試薬の混合液が流れるため、緩衝液及びニンヒドリン試薬の流速が高まった結果、これらの混合液の流速も高まり、反応コイルにおける混合液の線速度は、13.3m/minから28.2m/minに速まっており、20m/min以上の条件を満たすものとなっている。

【0192】また、 $(r^4 \cdot L2/f)$ の値も、 $1.24 \times 10^{-3} (\text{mm}^4 \cdot \text{m} / (\text{ml} / \text{min}))$ となり、 $2.5 \times 10^{-3}$ 以下の要件を満たしている。この時の拡がり $\sigma^*$ は、0.047(min) (=2.8(s))となり、0.067(min) (=4(s))以下の要件を満たしている。

【0193】反応コイルのサイズは同じであり、混合液の線速度が速まった結果、反応時間は、従来の110分分析法の0.53分から0.25分に短縮している。その結果として、感度が多少低下することになるが、この感度低下は実用上は問題ないものであり、この生体液60分分析のクロマトグラムを用いて後述する。

【0194】以上説明したようにして、生体液60分分析が可能となるが、そのとき着目すべき点に、分離率がある。分析時間が速まっても分離率が低下すれば、実用的でないが、以下に説明するように、本例においては、十分な分離率が得られている。

【0195】次に、本例による生体液60分分析に用いた緩衝液の組成について、表9を用いて説明する。

【0196】

【表9】

表9 生体液分析法用緩衝液の組成

名 称	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	PF-RG
緩衝液No.	1	2	3	4	5
Li濃度(N)	0.09	0.225	0.721	1.00	0.20
1. 蒸留水(約)	700 ml	700 ml	700 ml	700 ml	700 ml
2. クエン酸リチウム(4H <sub>2</sub> O)	5.73 g	9.80 g	8.79 g	9.80 g	—
3. 塩化リチウム	1.24 g	6.36 g	26.62 g	38.15 g	—
4. クエン酸(H <sub>2</sub> O)	19.90 g	12.00 g	11.27 g	3.30 g	—
5. 水酸化リチウム	—	—	—	—	8.40 g
6. エチルアルコール	30.0 ml	30.0 ml	100.0 ml	—	30.0 ml
7. チオジグリコール	5.0 ml	5.0 ml	—	—	—
8. ベンジルアルコール	—	—	3.0 ml	—	—
9. BRIJ-35 *	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
10. pH(公称値)	2.8	3.7	3.6	4.1	—
11. 全量(計量する)	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
12. カプリル酸	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

【0197】表9において、PF-1は、第1緩衝液の組成を表し、PF-2は、第2緩衝液の組成を表し、PF-3は、第3緩衝液の組成を表し、PF-4は、第4緩衝液の組成を表しており、RF-RGは、カラム再生液の組成を表している。

【0198】第1緩衝液PF-1は、Li濃度が0.09Nであり、蒸留水約700mlに対して、クエン酸リチウム(4H<sub>2</sub>O)を5.73g、塩化リチウム1.24g、クエン酸(H<sub>2</sub>O)を19.90g、エチルアルコールを30.0ml、チオジグリコールを5.0ml、BRIJ-35を4.0ml、カプリル酸0.1mlを溶解し、さらに、蒸留水を加えることによって、全量を1.0l(1000ml)としている。この第1緩衝液PF-1のpHは、2.8(公称値)である。

【0199】第2緩衝液PF-2は、第1緩衝液PF-1と同じ組成を有しているが、その組成比を表7に示すように変えたものである。従って、第2緩衝液PF-2のリチウム濃度は0.225であり、pHは、3.7である。

【0200】第3緩衝液PF-3は、第1緩衝液PF-1のチオジグリコールに代えてベンジルアルコールを3.0ml加えたものであり、その組成比は、表7に示すようになっている。従って、第3緩衝液PF-3のリチウム濃度は0.721であり、pHは、3.6である。

【0201】第4緩衝液PF-4は、第1緩衝液からエチルアルコール及びチオジグリコールを除いたものであり、その組成比を表7に示すとおりである。第4緩衝液PF-4のリチウム濃度は1.00であり、pHは、4.1である。

【0202】再生液RF-RGは、Li濃度が0.20

20 であり、蒸留水約700mlに対して、水酸化リチウムを8.40g、エチルアルコールを30.0ml、BRIJ-35を4.0ml、カプリル酸0.1mlを溶解し、さらに、蒸留水を加えることによって、全量を1.0l(1000ml)としている。

【0203】次に、本例による生体液60分分析の緩衝液の切替タイミングと各緩衝液の選択を示す分析プログラムについて、表10を用いて説明する。

【0204】

【表10】

表10 分析プログラム

STEP	TIME (min)	BUFFER (TOTAL 100%)					COLUMN TEMP
		V1	V2	V3	V4	V5	
1	0.0	100	—	—	—	—	38
2	2.0	—	—	—	—	—	31
3	10.0	100	—	—	—	—	
4	10.1	80	20	—	—	—	
5	11.0	—	—	—	—	—	58
6	16.8	70	30	—	—	—	
7	16.9	10	90	—	—	—	
8	17.5	—	—	—	—	—	40
9	22.0	10	90	—	—	—	
10	22.1	—	100	—	—	—	
11	23.0	—	—	—	—	—	70
12	25.0	—	100	—	—	—	
13	25.1	—	—	100	—	—	
14	34.5	—	—	—	—	—	45
15	35.5	—	—	100	—	—	
16	35.6	60	—	—	40	—	
17	38.5	60	—	—	40	—	
18	38.6	—	—	—	100	—	
19	44.0	—	—	—	100	—	
20	44.1	—	20	—	80	—	
21	48.0	—	—	—	—	—	70
22	52.0	—	20	—	80	—	
23	52.1	—	—	—	100	—	
24	57.5	—	—	—	100	—	
25	57.6	—	—	—	—	100	
26	63.0	—	—	—	—	100	
27	63.1	100	—	—	—	—	38
28	80.0	100	—	—	—	—	

【0205】表10において、左からステップ番号、各ステップの実行時間(分)、緩衝液の流量、分離カラムの温度(℃)を表している。

【0206】ステップ1～3、即ち、0.0分から10.0分までは、第1緩衝液を流す電磁弁V1を駆動して、第1緩衝液を100%流す。この時の分離カラムの温度は、ステップ1の0.0分では、38℃に温度制御されているが、ステップ2の2.0分では、31℃に温度を下げて温度制御する。

【0207】ステップ4、即ち、10.1分では、第1緩衝液を流す電磁弁V1及び第2緩衝液を流す電磁弁V2を駆動して、第1緩衝液80%：第2緩衝液20%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流す。電磁弁V1、V2の駆動は、パルス幅変調により行われるため、電磁弁V1の導通角を80%として、電磁弁V2の導通角を20%とし、電磁弁V1が開くタイミングで、電磁弁V2を閉じ、また、逆に、電磁弁V1を閉じるタイミングで、電磁弁V2を開くことにより、流量比の制御を行える。この時の分離カラムの温度も、31℃に温度制御されている。ステップ3とステップ4の間においては、第1緩衝液100%の状態から、第1緩衝液80%で第2緩衝液20%の状態に徐々に変化し、

グラジエントされる。

【0208】ステップ4からステップ6まで、即ち、10.1分から16.8分までは、第1緩衝液と第2緩衝液の流量比を徐々に変えるグラジエントを行う。ステップ4、即ち、10.1分では、第1緩衝液を流す電磁弁V1及び第2緩衝液を流す電磁弁V2を駆動して、第1緩衝液80%：第2緩衝液20%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流すのに対して、ステップ6の16.8分では、第1緩衝液70%：第2緩衝液30%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流す。ステップ4からステップ6まで、即ち、10.1分から16.8分までは、第1緩衝液と第2緩衝液の流量比を徐々に変えるグラジエントを行う。

【0209】また、その途中のステップ5、即ち、11.0分には、温度を58℃に上昇する温度制御を行う。

【0210】ステップ7～9、即ち、16.9分から22.0分までは、第1緩衝液を流す電磁弁V1及び第2緩衝液を流す電磁弁V2を駆動して、第1緩衝液10%：第2緩衝液90%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流す。ステップ6とステップ7の間においては、第1緩衝液70%で第2緩衝液30%の状態から、第1緩衝液10%で第2緩衝液90%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。また、途中のステップ8、即ち、17.5分では、温度40℃にする温度制御を行う。

【0211】ステップ10～12、即ち、22.1分から25.0分までは、第2緩衝液を流す電磁弁V2を駆動して、第2緩衝液を100%流す。ステップ9とステップ10の間においては、第1緩衝液10%で第2緩衝液90%の状態から、第2緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。また、途中のステップ11、即ち、23.0分では、温度70℃にする温度制御を行う。

【0212】ステップ13～15、即ち、25.1分から35.5分までは、第3緩衝液を流す電磁弁V3を駆動して、第3緩衝液を100%流す。ステップ12とステップ13の間においては、第2緩衝液100%の状態から、第3緩衝液100%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。また、途中のステップ14、即ち、34.5分では、温度45℃にする温度制御を行う。

【0213】ステップ16～17、即ち、35.6分から38.5分までは、第1緩衝液を流す電磁弁V1及び第4緩衝液を流す電磁弁V4を駆動して、第1緩衝液60%：第4緩衝液40%の流量比率で、全量が100%となるように、緩衝液を流す。ステップ15とステップ16の間においては、第3緩衝液100%の状態から、第1緩衝液60%で第4緩衝液40%の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

【0214】ステップ18～19、即ち、38.6分から

ら 44. 0 分までは、第 4 緩衝液を流す電磁弁 V 4 を駆動して、第 4 緩衝液を 100% 流す。ステップ 17 とステップ 18 の間においては、第 1 緩衝液 60% で第 4 緩衝液 40% の状態から、第 4 緩衝液 100% の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

【0215】ステップ 20~22、即ち、44. 1 分から 52. 0 分までは、第 2 緩衝液を流す電磁弁 V 2 及び第 4 緩衝液を流す電磁弁 V 4 を駆動して、第 2 緩衝液 20% : 第 4 緩衝液 80% の流量比率で、全量が 100% となるように、緩衝液を流す。ステップ 19 とステップ 20 の間においては、第 4 緩衝液 100% の状態から、第 2 緩衝液 20% で第 4 緩衝液 80% の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。また、途中のステップ 21、即ち、48. 0 分では、温度 70℃ にする温度制御を行う。

【0216】ステップ 23~24、即ち、52. 1 分から 57. 5 分までは、第 4 緩衝液を流す電磁弁 V 4 を駆動して、第 4 緩衝液を 100% 流す。ステップ 22 とステップ 23 の間においては、第 2 緩衝液 20% で第 4 緩衝液 80% の状態から、第 4 緩衝液 100% の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。

【0217】ステップ 25~26、即ち、57. 6 分から 63. 0 分までは、再生液を流す電磁弁 V 5 を駆動して、カラム再生液を 100% 流す。ステップ 24 とステップ 25 の間においては、第 4 緩衝液 100% の状態から、再生液 100% の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。カラム再生液を分離カラム内に流すことにより、分離カラムを洗浄し、カラム再生が行われる。

【0218】ステップ 27~28、即ち、63. 1 分から 80. 0 分までは、第 1 緩衝液を流す電磁弁 V 1 を駆動して、第 1 緩衝液を 100% 流す。ステップ 26 とステップ 27 の間においては、カラム再生液 100% の状態から、第 1 緩衝液 100% の状態に徐々に変化し、グラジエントされる。また、ステップ 27、即ち、63. 1 分では、温度 38℃ にする温度制御を行う。第 1 緩衝液を流すことによって、流路系を第 1 緩衝液で満たし、分離カラムを平衡化し、また、温度も初期温度である 38℃ にすることによって、次の分析に備えられる。

【0219】次に、図 9 を用いて、本実施例により標準試料中に含まれる生体液アミノ酸類緑物質のアミノ酸を分析したクロマトグラムを示すとともに、図 10 には、同一の標準試料について、従来の生体液 110 分分析法を用いて分析したときのクロマトグラムを示す。図 9 及び図 10 の横軸は、それぞれ、時間を示している。

【0220】図 9 から明らかなように、全成分の分析が、60 分で終了している。また、図 10 に示す従来の生体液 110 分分析法では、分析に 110 分を要している。即ち、本実施例では、生体液分析法によって 60 分、即ち、従来の約半分の時間という高速で、分析を可能としている。

【0221】図 9 及び図 10 を比較すると明かなように、Asp (アスパラギン酸) ~ Ala (アラニン) の間では、本実施例の方がクロマトピークの優れた分離を示している。クロマトグラムの分離の程度を図る指標としては、一般に、Thr (スレオニン) - Ser (セリン) の分離率や、Gly (グリシン) - Ala (アラニン) の分離率が用いられている。これらの分離率に基づいて、図 9 と図 10 に示される分離率を計算により求めて見ると、表 11 に示すようになる。

【0222】

【表 11】

表 11 生体液法分離率の比較

	従来法	実施例 5
Thr-Ser	96 %	98 %
Gly-Ala	98 %	99 %

【0223】図 10 に示す従来の生体液 110 分分析法では、Thr (スレオニン) - Ser (セリン) の分離率は、96% であるのに対して、本実施例では、その分離率は 98% に向上している。また、Gly (グリシン) - Ala (アラニン) の分離率は、従来の生体液 110 分分析法では、98% であるのに対して、本実施例では、その分離率は 99% に向上している。

【0224】即ち、図 9 と図 10 の対比から明かなように、本実施例では、生体液分析を 60 分の高速化でき、しかも、分離率を従来の生体液 110 分分析の場合よりも、向上させることができる。

【0225】また、図 9 の実施例の方が、クロマトピークの高さは、若干高くなっている。これは、横軸の時間軸が圧縮されたためであり、分析したアミノ酸成分の定量には、クロマトピークの面積法を採用するため、クロマトピークの高さが向上したことにより、2 つのピークを分離して面積をそれぞれに、より正確に求められることから測定精度の低下は見られないものである。

【0226】以上述べた本実施例によれば、従来は、不可能であった生体液法による 60 分分析が可能となった。

【0227】また、この際、分離率も従来の 110 分生体液法分析に比べて向上している。

【0228】以上の例に基づいて、本発明について整理してみると、以下のようになる。

【0229】即ち、分離カラムの使用限界は、緩衝液流速ではなく、カラム線速度によるものと考えられ、分析時間を短縮するために、このカラム線速度の限界を越えることなく、緩衝液流速を高める方法として、分離カラム内径を大きくするものとした。ちなみに、カラム内径が 4. 6 mm の分離カラムを流れる緩衝液流速が 0. 6 ml/min の時の、カラム線速度は、36 mm/min である。

【0230】そこで、上述した各例に示したように、分

離カラムの内径を大きくすることにより、緩衝液流速を速めることができ、分析時間は、標準法20分、標準法15分、生体液法60分というように、短縮でき、高速分析が可能となった。

【0231】また、この時、カラム効率を高めるため、イオン交換樹脂の粒径を、従来と同様に $3\mu\text{m}$ としておくと、粒径が小さいため、カラムの圧力損失が大きくなる。そこで、この圧力損失を小さくするために、分離カラムの全長を短くしている。

【0232】即ち、分離カラムの内径 $r$ は大きく、全長 $L1$ は短くするものである。ここで、(長さ $L1$ /内径 $r$ )の観点で捉えるならば、この値 $L1/r$ が、10以下が好ましい。

【0233】また、イオン交換樹脂の粒径は、カラム効率を良くする(理論段数を大きくする)ために、小さい方がよい。そこで、 $4\mu\text{m}$ 以下とする。また、 $4\mu\text{m}$ 以下の微細粒子を用いることにより、上述した分離カラムの使用限界が緩衝液線速度によって規定されるという現象が発生する。

【0234】また、分離カラムの内径について見ると、従来の標準30分分析を25分分析にして実用化しようとする、内径を $(30/25)^2$ 倍すればよく、 $4.6\text{mm} \times (30/25)^2$ は $5\text{mm}$ となるので、内径は、 $5\text{mm}$ 以上とすることが好ましい。

【0235】また、15分分析を可能とするには、同様にして、理論的には、内径を $6.5\text{mm}$ とすればよいが、実験的には、内径 $6\text{mm}$ で15分分析が可能となる。さらに、内径を大きくして、内径を $7\text{mm}$ 以上とすると、分析時間は早くすることができるが、感度の低下をもたらすため、内径は、高速分析の観点からは、 $5\text{mm}$ 以上で、感度の点からは、 $7\text{mm}$ 以下が実用的範囲である。即ち、実用的分離カラムの内径は、 $5\text{mm}$ 乃至 $7\text{mm}$ の範囲が実用的である。

【0236】分離カラムの全長を短くし、理論段数が低下すると、カラム外の拡がりが、分離に与える悪影響が大きくなる。カラム外の拡がりへの寄与を考えると、反応コイルは、カラム外の拡がりへ約80%寄与する流路部品であることが、実験により確かめられている。

【0237】ここで、反応コイル内の試料ゾーンの拡がり $\sigma$ を、時間を単位とする広がり $\sigma^*$ とした時、この広がり $\sigma^*$ を4s以下にすれば、分離上無視できるものと考えられる。この時間単位を分(min)とすると、 $0.067\text{min}$ 以下とすればよい。

【0238】時間を単位とする拡がり $\sigma^*$ は、反応コイルの内径 $r$ 、反応コイルの長さ $L2$ 及びカラム流速の関数となる。従って、拡がり $\sigma^*$ を、 $0.067\text{min}$ 以下とするための、 $(r^4 \cdot L2)/f$ の条件について求めると、拡散定数 $Dm$ は、 $1.20 \times 10^{-9} (\text{m}^2/\text{s})$ であることが実験的に求められているので、 $(r^4 \cdot L2)/f$ が、 $1.5 \times 10^{-7} (\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 以下であ

るとの条件を満たせばよい。これを、液体クロマトグラフで一般に使用する単位で表すと、 $(r^4 \cdot L2)/f$ が、 $2.5 \times 10^{-3} (\text{mm}^4 \cdot \text{m}/(\text{ml}/\text{min}))$ 以下となればよい。

【0239】また、時間を単位とする拡がり $\sigma^*$ は、流量 $f$ が増えるほど、小さくなる。つまり、所定の $r$ 、 $L2$ を与えられた場合、流量 $f$ を大きくすることによって、カラム外の拡がり $\sigma^*$ の影響を小さくすることができる。

【0240】一般に使用されている反応コイルの内径 $r$ は、 $0.25\text{mm}$ の上のサイズは、 $0.33\text{mm}$ である。時間を単位とする拡がり $\sigma^*$ に対しては、内径 $r$ の4乗で影響するので、内径 $r$ は、小さい方が好ましく、ここで、内径 $r$ を $0.25\text{mm}$ 以下のものとする。

【0241】反応コイルの長さ $L2$ は、長い方が、反応時間が長くとれるので、感度向上の点で好ましいが、反応コイルの長さ $L2$ を長くすると、拡がり $\sigma^*$ が大きくなるので、両者の兼ね合いの点から、長さ $L2$ を $10\text{m}$ 以下とする。

【0242】以上のようにして、反応コイルの内径 $r$ を $0.25\text{mm}$ 以下、長さを $10\text{m}$ 以下として、を満たすカラムを流れる液の流量 $f$  ( $\text{ml}/\text{min}$ )を求めると、 $2.5 \times 10^{-3} (\text{ml}/\text{min})$ 以上の条件を満たすように、反応コイルを流れる液の流量 $f$ とすればよいことが分かる。

【0243】ここで、上述の条件における反応コイルを流れる液の線速度を求めてみると、反応コイルの内径 $r$ が $0.25\text{mm}$ で、カラムを流れる液の流量 $f$ が $2.5 \times 10^{-3} (\text{ml}/\text{min})$ の時、線速度は、 $20 (\text{m}/\text{min})$ であればよいことが分かる。

【0244】

【発明の効果】本発明によれば、アミノ酸分析装置において、分析をより高速で、しかも、高分離なものとすることができる。

【0245】また、本発明によれば、アミノ酸分析装置において、カラム外拡がりの影響を勘案して、分離の損なわれることなく、高分離な分析が可能となる。

【0246】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の要点を説明するための図である。

【図2】クロマトグラムの拡がりを説明する図である。

【図3】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置の構成図である。

【図4】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置に用いたイオン交換樹脂を充填した分離カラムの断面図である。

【図5】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置における分離カラムを流れる緩衝液流速とカラム圧力の関係を示す図である。

【図6】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置を用

37

いて標準法20分分析を行った時のクロマトグラムである。

【図7】従来の標準法30分分析によるクロマトグラムである。

【図8】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置を用いて標準法15分分析を行った時のクロマトグラムである。

【図9】本発明の一実施例によるアミノ酸分析装置を用いて生体液法60分分析を行った時のクロマトグラムである。

【図10】従来の生体液法110分分析によるクロマトグラムである。

#### 【符号の説明】

- 1…第1緩衝液
- 2…第2緩衝液
- 3…第3緩衝液
- 4…第4緩衝液
- 5…再生液

6A, 6B, 6C, 6D, 6E…電磁弁

7…緩衝液ポンプ

8…アンモニアフィルタカラム

9…オートサンプラー

10…分離カラム

11…ニンヒドリン試薬

12…ニンヒドリンポンプ

13…ミキサ

14…反応コイル

15…光度計

16…データ処理装置

21…カラム筒

22…イオン交換樹脂

23…フィルタ

24…シール

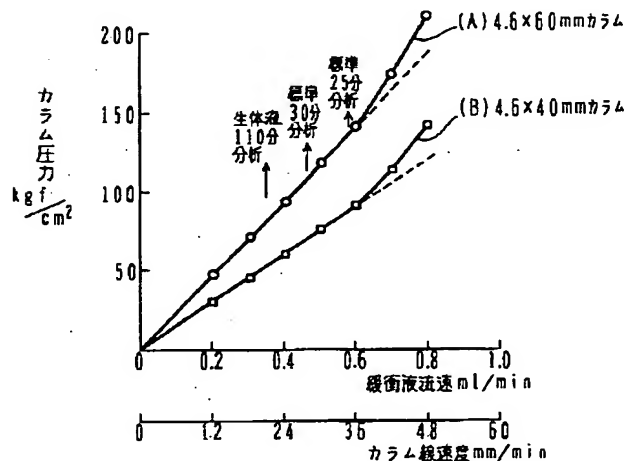
25…カラムキャップ

26…接続孔

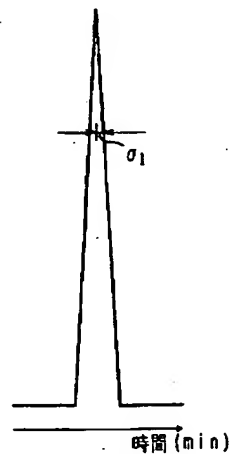
27…フィルタスペース

38

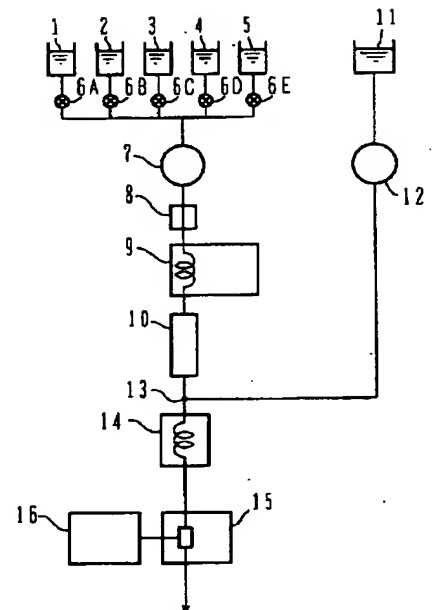
【図1】



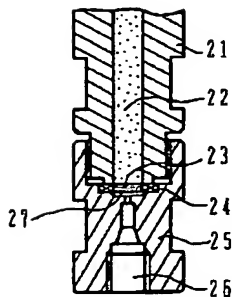
【図2】



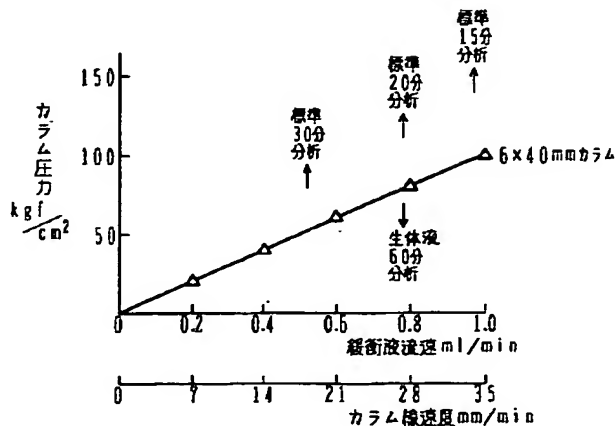
【図3】



【図4】

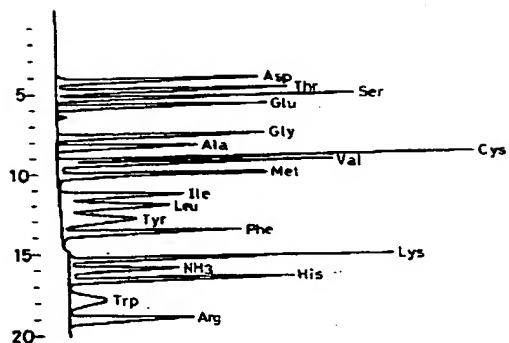


【図5】

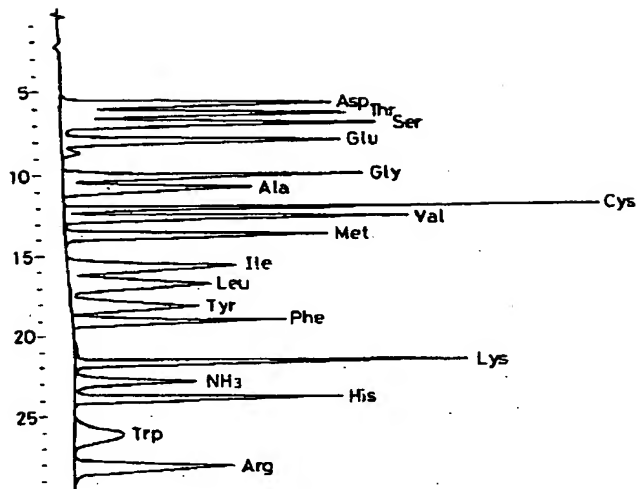


- 7: 緩衝液ポンプ
- 9: オートサンプラー
- 10: 分離カラム
- 14: 反応コイル

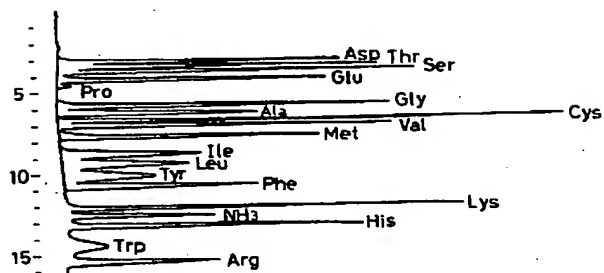
【図 6】



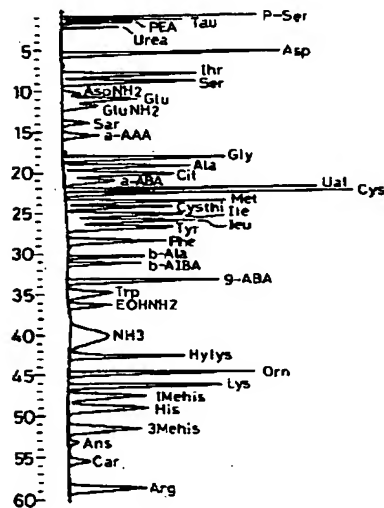
【図 7】



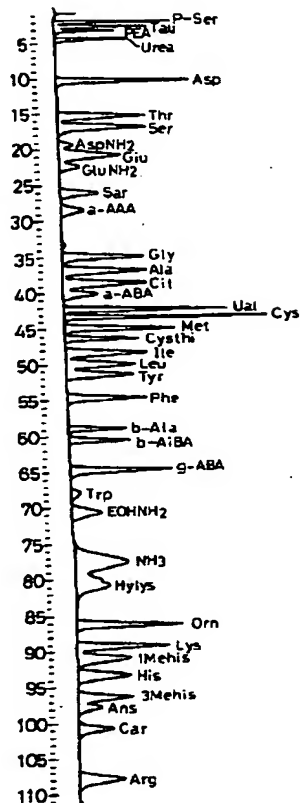
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/68

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 33/68

技術表示箇所

